

GIOVANA MACHADO SOUZA SIMÕES

**AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO DE RECEPTORES
ADRENÉRGICOS NA HIPER-REATIVIDADE CARDIOVASCULAR
AOS TESTES ESTRESSORES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

ORIENTADOR

Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez

CO-ORIENTADOR

Prof. Dra. Fátima Helena Sert Kuniyoshi

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória-ES, 17 de Junho de 2011

Simões, Giovana Machado Souza, 1977.

Associação do polimorfismo dos receptores α_1 e β_2 -adrenérgicos na reatividade pressórica durante manobras de simpato-excitação. (Vitória) 2011

163p, 29,7cm (UFES, M. Sc., Ciências Fisiológicas, 2011)

Tese de Doutorado, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF, Centro Biomédico.

1. Polimorfismo; 2. Receptores α_1 e β_2 -adrenérgicos ;
3. Hiper-reatividade pressórica; 4. Manobras simpato-excitatórias.

**AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO DE RECEPTORES
ADRENÉRGICOS NA HIPER-REATIVIDADE CARDIOVASCULAR
AOS TESTES ESTRESSORES**

Giovana Machado Souza Simões

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas

Aprovada em ... / ... / ...

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez (Orientador)

Prof^a. Dr^a. Ivani Credidio Trombetta (externo, USP)

Prof^a. Dr^a. Flávia Imbroisi Valle Errera (externo, Emescam)

Prof. Dra. Ivanita Stefanon

Prof. Dr. José Geraldo Mill

Coordenador do PPGCF:

Prof. Dr. Luis Carlos Schemberg

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Vitória, 17 de Junho de 2011

Dedico esta tese a Deus que sempre estendeu Suas mãos para erguer-me, dando coragem para prosseguir e realizar esse sonho. Ao meu esposo Huildson por estar sempre ao meu lado, incentivando em todos os momentos de minha vida e pelo amor incondicional. À minha irmã Fabiana, que tanto amo, por suas palavras de ânimo e coragem nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTO

Ao Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez, meu orientador e professor, pela imensa sabedoria, paciência e dedicação, pela influência na minha formação científica através do exemplo de persistência, ética e seriedade.

À Prof^a. Dra. Fátima Helena Sert Kuniyoshi, minha co-orientadora que me auxiliou com extrema competência e atenção, contribuindo para o meu conhecimento e realização desse estudo.

À Bianca Campagnaro, Clarissa Tonini e Fernanda Amorim, amigas de laboratório, pela paciência e suporte na realização prática deste estudo.

Aos demais colegas do laboratório, pela atenção, carinho e pelos auxílios prestados.

A todos os professores deste programa de pós-graduação, por terem acrescentado meu conhecimento e possibilitado meu crescimento profissional.

Aos voluntários deste estudo, que se disponibilizaram para auxiliar de modo direto em todas as etapas desta pesquisa. Sem vocês nada seria possível.

Muito obrigada.

IV

O Rio e o Oceano

Diz-se que, mesmo antes de um rio cair no oceano, ele treme de medo. Olha para trás, para toda a jornada: os cumes, as montanhas, o longo caminho sinuoso através das florestas, através dos povoados, e vê a sua frente um oceano tão vasto que entrar nele nada mais é que desaparecer para sempre.

Mas não há outra maneira.

O rio não pode voltar. Ninguém pode voltar. Voltar é impossível na existência. Você pode apenas ir em frente. O rio precisa se arriscar e entrar no oceano. E somente quando ele entra no oceano é que o medo desaparece, porque apenas então o rio saberá que não se trata de desaparecer no oceano.

Mas torna-se OCEANO.

Por um lado é desaparecimento e por outro é renascimento. Assim somos nós. Voltar é impossível na existência. Você só pode ir em frente e se arriscar. Coragem!

Torne-se um oceano.

Clarice Lispector

SUMÁRIO

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Lista de Anexos

Lista de Abreviaturas

Lista de Símbolos

Resumo

Abastract

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Cardiovasculares

1.2 O Sistema Nervoso Autônomo na Regulação da Pressão Arterial

1.3 Reatividade Pressórica e Cronotrópica aos Testes Laboratoriais de Estresse

2. Receptores Adrenérgicos no Controle do Sistema Cardiovascular

2.1 Receptores β -Adrenérgicos: características, localização e função.

2.2 Receptores α -Adrenérgicos: características, localização e função.

2.3 Polimorfismo dos Receptores β_2 -Adrenérgicos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

2.2 Objetivos Específicos

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Tipo de Estudo

3.2 Seleção da Amostra

3.2.1 Critérios de Inclusão

3.2.2 Critérios de Exclusão

3.3 Sequência Experimental

3.4 Avaliação Antropométrica

3.5 Coleta de sangue

3.6 Extração de DNA

3.6.1 Amplificação por PCR do Segmento de DNA Contendo o Códon 27 do receptor β_2 adrenérgico.....

3.6.3 Amplificação por PCR do segmento de DNA contendo o códon 492 do receptor α_1 -adrenérgico.....

3.7 Teste de Reatividade os Estresses.....

3.7.1 Estresse mental (*Stroop test*).....

3.7.2 Teste pressórico ao frio (*Cold pressor test*).....

3.7.3 Exercício isométrico de preensão manual (*Handgrip test*)

3.7.4 Avaliação da pressão arterial durante o estresse mental, teste pressórico ao frio e exercício isométrico.....

3.8 Análise estatística.....

4. RESULTADOS

4.1. Análise geral da amostra.....

4.1.1. Análise dos dados antropométricos e demográficos na população geral.....

4.1.2. Características hemodinâmicas da amostra nos testes de estresse.....

4.2 Testes de Estresse.....

4.2.1 - Teste de preensão manual isométrico (*Handgrip*).....

4.2.2. Teste de estresse mental (*Stroop test*).....

4.2.3. Teste pressórico ao frio (*Cold Pressor test*).....

4.3. Distribuição do polimorfismo dos receptores adrenérgicos β_2 e α_1 na população estudada.....

5. DISCUSSÃO.....

6. CONCLUSÃO.....

ANEXOS.....

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de estudos na literatura envolvendo a aplicação dos testes de estresse laboratoriais.....

Tabela 2 - Exemplos de estudos na literatura envolvendo o polimorfismo β_2 -adrenérgico (Arg16Gly).....

Tabela 3 - Descrição de trabalhos relacionados com o polimorfismo de receptor β_2 -adrenérgico (Gln27Glu).....

Tabela 4 - Descrição de trabalhos relacionados com o polimorfismo de receptor α_1 -adrenérgico (Arg492Cys).....

Tabela 5 - Características gerais e perfil bioquímico dos sujeitos da amostra.....

Tabela 6 - Avaliação da frequência genotípica e alélica da população do presente estudo, quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg.....

Tabela 7 - Distribuição da frequência dos genótipos nos receptores adrenérgicos β_2 e α_1 , nos indivíduos com hiper-reatividade pressórica e cronotrópica ao teste isométrico.

Tabela 8 - Distribuição da frequência dos alelos nos receptores adrenérgicos β_2 e α_1 , nos indivíduos com hiper-reatividade pressórica ao teste isométrico.....

Tabela 9 - Distribuição da frequência dos genótipos nos receptores adrenérgicos β_2 e α_1 , nos indivíduos com hiper-reatividade pressórica e cronotrópica teste de estresse mental.....

.

Tabela 10 - Distribuição da frequência dos alelos nos receptores adrenérgicos β_2 e α_1 , nos indivíduos com hiper-reatividade pressórica ao teste de estresse mental.....

Tabela 11 - Distribuição da frequência dos genótipos nos receptores adrenérgicos β_2 e α_1 , nos indivíduos com hiper-reatividade pressórica e cronotrópica teste de estresse ao frio.....

Tabela 12 - Distribuição da frequência dos alelos nos receptores adrenérgicos β_2 e α_1 , nos indivíduos com hiper-reatividade pressórica ao teste de estresse ao frio.....

Tabela 13 - Distribuição da frequência dos genótipos nos receptores adrenérgicos β_2 e α_1 , nos indivíduos com e sem história para antecedentes familiares de doenças cardiovasculares.....

Tabela 14 - Distribuição da frequência dos alelos nos receptores adrenérgicos β_2 e α_1 , nos indivíduos com e sem história para antecedentes familiares de doenças cardiovasculares.....

Tabela 15 - Distribuição da frequência dos genótipos nos receptores adrenérgicos β_2 e α_1 , comparando mulheres com homens na amostra total.....

Tabela 16 - Distribuição da frequência dos alelos nos receptores adrenérgicos β_2 e α_1 , comparando mulheres com homens na amostra total.....

Tabela 17 - Distribuição da frequência dos genótipos nos receptores adrenérgicos β_2 e α_1 , nos indivíduos com hiper-reatividade pressórica aos testes de estresse (1 ou mais testes).....

Tabela 18 - Frequência dos genótipos nos receptores adrenérgicos β_2 e α_1 , em indivíduos com hiper-reatividade cronotrópica à 1 ou mais testes estressores.....

Tabela 19 - Distribuição da frequência dos genótipos nos receptores adrenérgicos β_2 e α_1 , nos indivíduos com hiper-reatividade pressórica e cronotrópica aos testes de estresse (1 ou mais testes).....

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura dos receptores adrenérgicos.....

Figura 2. Polimorfismos genéticos.....

Figura 3. Modelo topológico do receptor α_1 -adrenérgico.....

Figura 4 - *Check-gel* em acrilamida a 10%. A primeira coluna representa o ladder de 50bp (L50), seguido da segunda coluna mostrando o fragmento íntegro do PCR, antes de sofrer a clivagem pela enzima de restrição, para uma bateria de 10 amostras (1C a 10C).....

Figura 5 - *Check-gel* em acrilamida a 10%. Na figura podemos observar o ladder de 10bp e 100bp (L10 e L100), na primeira e segunda colunas seguido de amostras com fragmentos de interesse no estudo.....

Figura 6 - *Check-gel* em acrilamida a 10%. Na figura podemos observar o ladder de 100bp (L100) na primeira coluna à esquerda, seguido de fragmento íntegro do PCR, antes de sofrer a clivagem pela enzima de restrição.....

Figura 7 - Esquema mostrando a folha de teste de conflito cor/ palavras (teste de Stroop) aplicado a cada um dos voluntários.....

Figura 8 - Indivíduo com a submersão do braço em água gelada durante o teste pressórico ao frio (*Cold pressor test*).....

Figura 9 - Indivíduo utilizando o dinamômetro digital para a verificação de sua força de preensão isométrica.....

Figura 10 - Aparelho automático (oscilométrico) utilizado para a aferição da pressão arterial casual e nos testes de estresses.

Figura 11 - Valores de medidas casuais de pressão arterial sistólica (●) e diastólica (o) e frequência cardíaca. Valores representam a média \pm desvio padrão. * $p < 0.05$ entre gêneros (teste t de Student para amostras independentes).....

Figura 12 - Alterações absolutas de PAS, PAD e FC durante os três testes de estresse, comparando indivíduos sem e com história de antecedentes familiares para doenças cardiovasculares. * $p < 0,05$ comparado com os indivíduos sem história familiar (teste X^2).....

Figura 13 - Frequência de distribuição dos valores de alteração cronotrópica absoluta frente aos 3 tipos de testes estressores. A linha horizontal no meio do *box* representa a mediana. A linha superior indicada pela seta representa o percentil 75º da amostra em cada um dos três testes estressores aplicados.....

Figura 14 - Frequência de distribuição dos valores de alteração pressórica absoluta frente aos 3 tipos de testes estressores. A linha horizontal no meio do *box* representa a mediana. A linha superior indicada pela seta representa o percentil 75º da amostra de cada um dos três testes estressores.....

Figura 15 - Variação da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) frente ao teste isométrico de preensão manual (*handgrip*) e respectiva recuperação, comparando-se homens e mulheres. Os valores indicam a média \pm DP e entre parênteses são mostradas as variações relativas. $p < 0,05$ indica diferença significativa comparando as variações relativas entre mulheres e homens (teste *t* de Student para amostras independentes).....

Figura 16 - Frequência de indivíduos que apresentam hiper-reatividade pressórica e cronotrópica ao teste de exercício físico isométrico de preensão manual (*Handgrip*), mostrando a influência do gênero e da história de antecedentes familiares para doenças cardiovasculares (DCV). * $p < 0.01$ calculado pelo teste X^2 para comparação de duas proporções de amostras independentes.....

Figura 17 - Variação da pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) frente ao teste de estresse mental (*Stroop test*) e respectiva recuperação, comparando-se homens e mulheres. Os valores indicam a média \pm desvio padrão e entre parênteses são mostradas as variações relativas. $p < 0,05$ indica diferença significativa comparando as variações relativas entre gêneros (teste *t* de Student para amostras independentes).....

Figura 18 - Frequência de indivíduos que apresentam hiper-reatividade pressórica e cronotrópica ao teste de estresse mental (*Stroop test*), mostrando a influência do gênero e da história de antecedentes familiares para doenças cardiovasculares (DCV).

*p<0.05 calculado pelo teste X^2 para comparação de duas proporções de amostras independentes.....

Figura 19 - Variação da pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) frente ao teste de estresse ao frio (*Cold pressor test*) e respectiva recuperação. Os valores indicam a média \pm DP e entre parênteses são mostradas as variações relativas. $p<0,05$ indica diferença significativa comparando as variações relativas entre mulheres e homens (teste t de Student para amostras independentes)..

Figura 20 - Frequência de indivíduos que apresentam hiper-reatividade pressórica e cronotrópica ao teste de estresse ao frio (*Cold Pressor test*), mostrando a influência do gênero e da história de antecedentes familiares para doenças cardiovasculares (DCV). *p<0.05 calculado pelo teste X^2 para comparação de duas proporções de amostras independentes.....

Figura 21 – Resposta pressórica e cronotrópica aos testes estressores aplicados, comparando homens e mulheres. Valores representam a média \pm desvio padrão. * $p<0,05$ comparado com o grupo de mulheres (teste t de Student para amostras independentes).....

Figura 22 - Percentagem de indivíduos com hiper-reatividade pressórica (PAS e/ou PAD) e/ou cronotrópica nas três diferentes manobras laboratoriais de testes estressores. * $p<0,05$ comparado com os indivíduos sem história de antecedentes familiares para doenças cardiovasculares (teste X^2).....

LISTA DE ABREVIATURAS

ADR	Receptor Adrenérgico
AMPc	Adenosina 3,5 - monofosfato cíclico
C	citossina
CVM	Contração Voluntária Máxima
DAC	Doença Arterial Coronariana
DAG	Diacilglicerol
DC	Débito Cardíaco
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FC	Frequência Cardíaca
G	Guanina
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutâmico
HA	Hipertensão Arterial
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
IP ₃	Inositol-1,4,5-Trifosfato
MAPA	Monitorização Ambulatorial da Pressão Arterial
NA	Noradrenalina
NTS	Núcleo do Trato Solitário

OR	<i>odds ratio</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAS	Pressão Arterial Sistólica
pb	pares de base
RPT	Resistência Periférica Total
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
T	Timina
VS	Volume Sistólico

LISTA DE SÍMBOLOS

kg	quilograma
m	metro
min	minuto
ml	mililitro
$\mu\text{g/ml}$	micrograma por mililitro
kg/m^2	quilograma por metro quadrado
mmHg	milímetro de mercúrio
ml/kg/min	mililitros por quilograma de peso corporal por minuto
ml/min/100ml	mililitro de sangue por minuto por 100 mililitros de tecido
%	por cento
DP	desvio padrão
α	alfa
β	beta

RESUMO

Introdução: No Brasil, as doenças cardiovasculares é a principal causa de morbimortalidade, sendo responsável por 27,4% dos óbitos causados por doenças de origem cardiovascular (Ministério da Saúde, 2007; VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2010). Em recente estudo epidemiológico realizado em nosso município (Projeto MONICA) foi verificado que 37% dos indivíduos na faixa de 18 a 64 anos de idade eram portadores de hipertensão arterial sistêmica (Molina, 2002). A detecção precoce de antecedentes familiares para as doenças cardiovasculares permite a avaliação de seu desenvolvimento bem como aplicação de medidas profiláticas, retardando ou até evitando a instalação de lesões em órgãos-alvo. Portanto, nosso estudo visa verificar a associação do polimorfismo dos receptores β_2 e α_1 -adrenérgicos com a resposta pressórica e cronotrópica exagerada durante os testes laboratoriais de estresse, em indivíduos normotensos. Bem como, correlacionar às respostas hemodinâmicas com o gênero e história de antecedentes familiares dos testes estressores.

Materiais e Métodos: Foram recrutados 98 voluntários de ambos os sexos (50mulheres/48 homens), na faixa etária de 20 a 55 anos. Obedecendo aos critérios de inclusão e autorização escrita pelo TCLE, foram obtidas medidas do peso corporal (kg), altura (m) e calculado o índice de Massa Corporal ($IMC = \text{peso}/\text{altura}^2$). Sendo excluídos voluntários com patologias cardíacas associadas, diabetes mellitus e obesidade ($IMC > 30 \text{ Kg/m}^2$). Foi realizada coleta de amostras de sangue venoso periférico de jejum de 8 horas, para avaliação bioquímica (glicemia de jejum, colesterol total e frações, triglicérides) e para a extração do DNA, a fim de determinar o polimorfismo por análise de restrição de fragmentos polimórficos (RFLP), extração de DNA, seguida de amplificação por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) para polimorfos Arg16Gly, Gln27Glu e Arg492Cys, digestão do produto amplificado, com genotipagem no gel de acrilamida 10%. Realizadas medidas de PA casual, seguida da aplicação do teste de *Handgrip*, *Stroop color test* e *Cold pressor*. Como análise estatística, foi utilizado teste t de *student* para amostras independentes. Na análise não-paramétrica de variáveis categóricas, estas foram comparadas utilizando-se o χ^2 (qui-quadrado), incluindo o teste de comparação de proporções. Foram consideradas significantes as diferenças entre duas amostras quando $p < 0.05$. O teste de Hardy-Weinberg foi realizado para obter as frequências alélicas e genotípicas e verificar se a população estudada está em equilíbrio genético. Seguido da análise do desequilíbrio de ligação,

de modo manual e posteriormente confirmado através do *software Arlequin 3.11 (freeware)* para análise de dados de genética populacional.

Resultados: Verificamos que mesmo tratando-se de uma amostra saudável, os voluntários do gênero masculino responderam com incrementos pressóricos maiores quando comparados às mulheres, aos três testes estressores. Constatamos a associação entre história familiar de doenças cardiovasculares com hiper-reatividade na PAS no teste de estresse mental e com maiores aumentos de PAD nos três testes. Estabelecemos pela primeira vez, critérios para classificar os indivíduos como hiper-reativos aos diferentes testes, com base no percentil 75°.

Conclusões: Podemos concluir que não verificamos associação do polimorfismo Arg16Gly e Gln27Glu para os β_2 -adrenoceptor e Arg492Cys para α_1 -adrenoceptor, com a hiper-reatividade pressórica e cronotrópica nos três testes laboratoriais de estresse, aplicados nos indivíduos da amostra. Concluimos que este é o primeiro trabalho a descrever na literatura critério de classificação para normo- e hiper-reatividade.

ABSTRACT

Background: In Brazil, the cardiovascular disease are the main cause of morbidity, being responsible for 27,4% of the deaths caused for illnesses of cardiovascular origin (Health department, 2007; VI Brazilian Lines of direction of Arterial Hypertension, 2010). In recent study epidemiologist carried through in our city (Project MONICA) it was verified that 37% of the individuals in the band of 18 the 64 years of age were carrying of systemic arterial hypertension (Molina, 2002). The precocious detention of familiar antecedents for the cardiovascular disease allows the evaluation of its development as well as application of prophylactic measures, being late or until preventing the installation of injuries in agency-target. Therefore, our study it aims at to verify the association of the polymorphism of the beta2 and alpha1-adrenergics receptor with exaggerated the pressor and cardiac output reply during the laboratorial stress tests, in normotenses individuals. As well as, to correlate the hemodynamic responses with the sort and history of familiar antecedents of the stress tests

Methods: The enlisted 98 volunteers of both (50mulheres/48 men), in the etária band of 20 the 55 years. Obeying the criteria of inclusion and authorization written for the TCLE, they had been gotten measured of the weight corporal (kg), height (m) and calculated the index of Corporal Mass ($IMC = \text{peso} / \text{altura}^2$). Being excluded voluntary with cardiac disease associates, diabetes mellitus and obesity ($IMC > 30 \text{ Kg/m}^2$). Collection of samples of peripheral venous blood of jejum of 8 hours was carried through, for evaluation biochemist (glicemia of jejum, total cholesterol and fractions, triglicérides) and for the extration of the DNA, in order to determine the polymorphism for analysis of restriction of polymorphism fragmentos (RFLP), extration of DNA, followed of amplification for *Polymerase Chain Reaction* (PCR) for polimorfos Arg16Gly, Gln27Glu and Arg492Cys, digestion of the amplified product, with genotipagem in the gel of acrilamida 10%. Carried through measured of accidental Pará, followed of the application of the test of *Handgrip*, *color Stroop test* and *pressor Cold*. As analysis statistics, test t of student for independent samples was used. In the not-parametric analysis of categorical 0 variable, these had been compared using the *qui-square*, including the test of comparison of ratio. The differences between two samples had been considered significant when $p < 0.05$. The test of Hardy-Weinberg was carried through to get the alélicas frequencies and genotypc and to verify if the studied population it is in genetic balance. Followed of the analysis of the disequilibrium

of linking, manual way and later confirmed through software Arlequin 3,11 (freeware) for analysis of data of population genetics.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO:

1.1 Doenças Cardiovasculares

As doenças cardiovasculares constituem a principal causa de morte nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (*American Heart Association - Guideline*, 2011). No Brasil, em 2003, 27,4% dos óbitos foram decorrentes de tais doenças, sendo a hipertensão arterial sistêmica (HAS) a principal causa e reconhecida como fator de risco para a doença cerebrovascular (isquêmica ou hemorrágica), doença arterial coronariana (DAC), insuficiência renal crônica e doença vascular de extremidade (DOREA & LOTUFO, 2004; VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2010).

No Brasil, de acordo com dados estatísticos, a hipertensão arterial acomete mais de 20% da população adulta urbana (com mais de 18 anos), período esse que, em geral, os indivíduos apresentam a maior contribuição social relacionado ao seu desempenho no trabalho (LOTUFO, 1998; YUSUF et al, 2001; MILL et al, 2004; BARRETO et al., 2006).

Vários estudos de bases populacionais evidenciam a importância do controle da hipertensão para a redução da morbi-mortalidade cardiovascular (JARDIM et al., 2007; MALTA et al., 2009; ROSÁRIO et al., 2009). Desta forma, as elevadas taxas de acometimento cardiovascular em países de industrialização recente parecem depender de modo importante para uma elevada prevalência de indivíduos hipertensos nesses países (MACMAHON et al., 1995; PASSOS et al., 2006; VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2010).

O estudo MONICA (*"MONICA Communities Study"*), realizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), em 36 países, revela uma ampla variação nos padrões de

fatores de risco nas diversas populações estudadas. Sendo parte desse estudo uma amostra populacional de nosso município, sob coordenação do Prof. Dr. José Geraldo Mill (Universidade Federal do Espírito Santo) no qual foi constatado que 37% das pessoas são portadoras de HAS (MOLINA, 2002).

Esses dados são alarmantes, pois níveis elevados de pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) têm associação etiológicamente significativa com doença cardiovascular (VASAN et al, 2001). Isto tem importante repercussão sócio-econômica, pois a hipertensão é responsável pelo desencadeamento de diversas complicações, tanto cardiovasculares quanto neurológicas, bem como pela alta frequência de internações hospitalares e elevado custo financeiro (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2010).

1.2 O Sistema Nervoso Autônomo na Regulação da Pressão Arterial

O sistema cardiovascular é o principal responsável pelo transporte de todas as substâncias necessárias ao bom funcionamento celular e a remoção dos produtos resultantes do metabolismo corporal. Para que isso se processe de forma adequada, a perfusão sanguínea tecidual e os níveis de PA precisam ser mantidos dentro de limites adequados. Portanto, essa manutenção depende de fatores físicos como o volume sanguíneo e a capacitância da circulação, sendo resultante da combinação instantânea entre o débito cardíaco (DC), que é influenciado pela frequência cardíaca (FC) e volume sistólico (VS), a resistência periférica e a capacitância venosa (KAPLAN, 1998; MICHELINI, 1999).

Todavia, a manutenção e a variação momento-a-momento da PA dependem de mecanismos complexos que determinam ajustes apropriados da frequência e contratilidade cardíaca, do estado contrátil dos vasos (de resistência e de capacitância) e da distribuição de fluído dentro e fora dos vasos. Para tal controle, é

necessária uma ação integrada e complexa dos mecanismos neurais (KAPLAN, 1998; MICHELINI, 1999; BEUTEL et al, 2006).

Dos mecanismos de regulação, o sistema nervoso autonômico é o ativado mais rapidamente frente a uma alteração aguda na PA, promovendo ajustes rápidos e de curta duração (segundos) principalmente pela ação de arcos reflexos cardiovasculares, que incluem os barorreceptores (pressão arterial), os receptores cardiopulmonares (volume central) e os quimiorreceptores arteriais, todos estes envolvidos na modulação da atividade simpática (CONSOLIM-COLOMBO & KRIEGER, 2000; IRIGOYEN et al., 2005; HAIBARA & SANTOS, 2007).

1.3 Reatividade Pressórica e Cronotrópica aos Testes Laboratoriais de Estresse

Diferentes métodos têm sido utilizados para identificar a relação entre hipertensão e doenças cardiovasculares (PEREIRA & KRIEGER, 2005). A HAS é uma doença de instalação lenta e progressiva, e pelo fato de em suas fases iniciais não provocar sintomas, muitos indivíduos só reconhecem a presença da doença depois que alterações estruturais e funcionais cardiovasculares já tenham ocorrido na fase crônica da doença. Portanto, a detecção precoce da susceptibilidade do indivíduo normotenso de desenvolver a hipertensão é de grande importância para prevenção e até mesmo para o tratamento da doença (BRAUNWALD, 1987).

O reconhecimento dos fatores que contribuem para o indivíduo desenvolver a doença auxilia no diagnóstico precoce e na aplicação de medidas não farmacológicas de prevenção ou do tratamento mais adequado quando a condição já está instalada (PEREIRA & KRIEGER, 2005).

Vários tipos de testes laboratoriais já foram desenvolvidos visando determinar a presença ou não de predisposição ao desenvolvimento de hipertensão. De fato, o

diagnóstico precoce das doenças cardiovasculares, principalmente a HAS, transformou-se numa meta mais viável depois que ficou demonstrado que a manifestação da hiper-reatividade pressórica detectada pelo uso de testes clínicos de estresse, mais especificamente em testes de esforço físico, estava relacionada ao curso evolutivo da PA no futuro (HERKENHOFF et al., 1994). Desta forma, portadores de hiper-reatividade pressórica em testes de esforço deveriam manter vigilância pressórica mais freqüente aumentando a probabilidade de diagnóstico precoce da doença.

Os testes laboratoriais de estresse são amplamente utilizados na pesquisa clínica cardiovascular como ferramentas para avaliar as respostas pressóricas e cronotrópicas via sistemas neurais reflexos, frente a situações de simpatoexcitação. Dessa forma, eles possibilitam a realização de estudos que procuram avaliar o comportamento cardiovascular (normalmente da PA e FC) frente a estímulos externos que determinam aumento de atividade no sistema nervoso simpático (PEREIRA, 2002).

Os testes laboratoriais de estresse podem ser divididos em duas categorias principais: os que envolvem o aspecto emocional do indivíduo, como: estresse mental pelo conflito de cor/palavra (*Stroop Color Test*) (STROOP JR, 1935; YEUNG AC, 1991; HERKENHOFF FL, LIMA EG, VASQUEZ EC 1994; LOURES et al., 2002), teste matemático, dentre outros; e os que promovem estímulos físicos, como: exercício isométrico de preensão manual ou *Handgrip* (ALAM M & SMIRK FH, 1937; DIGHIRO et al., 1974; HERKENHOFF FL, LIMA EG, VASQUEZ EC 1994; TROMBETTA et al., 2005) e teste pressórico ao frio ou *Cold Pressor Test* (HINES & BROWN, 1936; FL, LIMA EG, VASQUEZ EC 1994; HERKENHOFF & LIMA, 2007).

A resposta hemodinâmica varia conforme o teste e a própria resposta fisiológica de interação do estímulo e o indivíduo. O teste de estresse mental tem por objetivo simular situações de estresse cotidiano ou psicológico de forma padronizada e em ambiente controlado sob monitorização hemodinâmica. Esse teste é um conhecido fator capaz de desencadear eventos cardiovasculares como infarto agudo do miocárdio, arritmias malignas e morte súbita (MITTLEMAN et al., 1995). Neste tipo de teste a principal alteração observada tem sido a PAD (NOBREGA ACL, CASTRO RRT, SOUZA AC, 2007).

Por outro lado, o mecanismo envolvido na resposta no teste ao frio é decorrente do estímulo neural à ativação de nociceptores, que se inicia na periferia e propaga-se em direção ao sistema nervoso central (SNC) mediante a sinalização das modificações de temperatura na pele, principalmente pelo corpúsculo de Krauser e terminações nervosas livres (VELASCO et al., 1997). Esse estímulo é integrado por estruturas bulbares que incluem a região rostro-ventrolateral (RVLM). Em seguida, essa informação é passada ao sistema límbico, controlador das emoções, que mantém estreita ligações com o sistema nervoso autônomo, através de conexões com o hipotálamo. Essa estrutura do diencefalo possui áreas de controle do sistema simpático e parassimpático, além de poder controlar o sistema endócrino, através de suas ligações com a hipófise (TAVARES, LIMA E VASQUEZ, 1989). Como resultado ocorre aumento da atividade simpática direcionada para os vasos de resistência, havendo então aumento da pressão arterial, tanto sistólica como diastólica, sem significantes alterações na frequência cardíaca (MENKES et al., 1989; LAFLECHE et al., 1998).

Em relação ao teste isométrico, Cohen e Abdala (2003), relataram que a contração isométrica é uma condição na qual a tensão gerada no músculo tem igual magnitude à carga imposta sobre ele, mas em sentido oposto. Como consequência não há variação

do comprimento do músculo, sendo que eles atuam sem que haja movimento articular. Sendo assim, observa-se aumento da FC, com manutenção do volume sistólico (eventualmente podendo ser reduzido) e pequeno acréscimo do débito cardíaco. Em compensação, ocorre aumento da resistência vascular periférica, que resulta na elevação exacerbada da pressão arterial tanto sistólica como diastólica (LOPES et al., 2001; HERKENHOFF FV e LIMA EG, 2007). Estes efeitos ocorrem porque a contração muscular mantida durante altos percentuais da contração isométrica máxima promove a obstrução mecânica do fluxo sanguíneo muscular, o que faz com que os metabólitos produzidos durante a contração se acumulem ativando quimiorreceptores musculares, que promovem aumento expressivo da atividade nervosa simpática (PARATI & MANCIA, 1987; FORJAZ & TINUCCI, 2000).

Tabela 1 - Exemplos de estudos na literatura envolvendo a aplicação dos testes de estresse laboratoriais.

Autores	População	Sujeitos	Resposta aos Testes de Estresse
Cavalcante et al., 1997	Brasil	32 adolescentes brancos, 16 com história familiar para hipertensão	Filhos de hipertensos são hiper-reativos ao teste <i>Handgrip</i>
OUTRA	REFERÊNCIA		
Luccini et al., 2002	Itália	Homens brancos, obesos e hipertensos	Correlação positiva entre hipertensão e hiper-reatividade ao estresse mental
Nóbrega et al., 2007	Brasil	Adultos normotensos	Hiper-reatividade em mais de 50% dos indivíduos ao teste de esforço (ergometria).
Herkenhoff, 1996	Brasil	Homens de 35 a 50 anos, normotensos.	Resposta hemodinâmica similar entre o teste pressórico ao frio e <i>Handgrip</i> .
Markovitz et al., 1998	EUA	Adultos jovens, brancos e negros, 18 a 30 anos de idade	Maior resposta de PAS em negros no teste estresse mental

Existe evidência de que o teste pressórico ao frio poderia predizer o desenvolvimento de HAS em adolescentes obesos, porém ainda em fase de normotensão (KELSEY et al., 2000). Além disso, os estudos em adultos jovens indicaram que os negros, que estão em maior risco de desenvolver hipertensão arterial precocemente, apresentam maior reatividade vascular durante o teste pressórico ao frio em relação aos brancos (VOORS AW, WEBBER LS e BERENSON GS, 1980).

Todos os testes de estresse experimentais resguardam suas especificidades e aplicações diferenciadas, e foram propostos inicialmente com o objetivo primordial de realizar o diagnóstico precoce da doença hipertensiva. Seus autores acreditavam que um período de hiperatividade cardiovascular antecedia o desenvolvimento da HAS estabelecida (HERKENHOFF et al., 1994; HERKENHOFF & LIMA, 2007). Desta forma, a estimulação nervosa através de estímulos estressores externos seria capaz de amplificar a hiper-reatividade latente e revelar antecipadamente a tendência ao desenvolvimento desta afecção em indivíduos normotensos (KANNEL WB, 1996).

Atualmente as investigações epidemiológicas permitem, afirmar que o surgimento das doenças cardiovasculares está na dependência de diversos fatores interligados, como os fatores genéticos e ambientais, sendo a participação dos primeiros variando entre 30 a 60% (CAULFIELD et al., 1994). Diversos estudos verificaram a correlação de antecedentes familiares e entre pessoas com diferentes graus de parentesco, porém com os mesmos hábitos. Todavia, essa correlação foi mais acentuada entre pais e filhos consangüíneos, tornando-se maior entre gêmeos dizigóticos e, ainda triplicou-se, entre gêmeos monozigóticos. Importantes estudos evidenciam a forte influência

genética no comportamento das doenças cardiovasculares (FALKNER et al., 1981; CAULFIELD et al., 1994).

Um terço dos fatores envolvidos nas doenças cardiovasculares pode ser atribuído as variações genéticas, sendo assim, atualmente há evidências de que a hipertensão, doença isquêmica do coração, acidente vascular encefálico e até mesmo um importante fator de risco como a obesidade, tem forte componente genético (HARRAP et al., 1994; PEREIRA AC & KRIEGER JE, 2001; BARRETO-FILHO JAS & KRIEGER JE, 2003).

2. Receptores Adrenérgicos no Controle do Sistema Cardiovascular

Kahn, em 1976 definiu o termo receptor como sendo um complexo de moléculas, capaz de reconhecer e interagir com hormônio, droga ou neurotransmissor e, após esta interação, gera sinal capaz de iniciar uma cadeia de eventos que resulta em resposta biológica (KAHN, 1976).

Em 1948, Ahlquist relatou em seu estudo dois padrões na habilidade de alguns agonistas em desencadear respostas farmacológicas diferenciadas em vários órgãos e propôs a divisão dos receptores adrenérgicos em dois subtipos: beta (β) e alfa (α). Ambos são encontrados tanto no sistema nervoso central quanto no periférico e são ativados pela liberação, por via circulatória, de catecolaminas, adrenalina e noradrenalina (NA), sendo importantes mediadores das respostas do sistema autonômico simpático (AHLQUIST, 1948; FURCHGOTT, 1967).

A maior parte das terminações simpáticas pós-ganglionares tem como neurotransmissor a NA e possuem armazenamento em vesículas granulosas no botão

sináptico. O potencial de ação promove um influxo de cálcio para a terminação nervosa, havendo fusão da vesícula com a membrana plasmática e exocitose do neurotransmissor na fenda sináptica, ativando assim os receptores adrenérgicos na membrana pós-sináptica. Essa estimulação causa modificação do estado funcional das células efetoras, como exemplo, sua ação no nó sinusal causa elevação da frequência de despolarização das células do marca-passo cardíaco promovendo taquicardia. Entretanto, a estimulação dos receptores adrenérgicos pré-sinápticos causa uma inibição da liberação adicional da NA, reduzindo a atividade simpática (ATALA & CONSOLIM-COLOMBO, 2007).

Os adrenoceptores são membros da superfamília de receptores acoplados à proteína G (Figura 1), os quais compartilham entre si estruturas importantes, como terminais aminos extracelulares com local para N-Glicosilação, 7 domínios α helicais transmembrânicos e a presença de um terminal carboxi intracelular contendo seqüências de aminoácidos que indicam locais prováveis de fosforilação por uma ou mais proteínas-Kinases (INSEL, 1996).

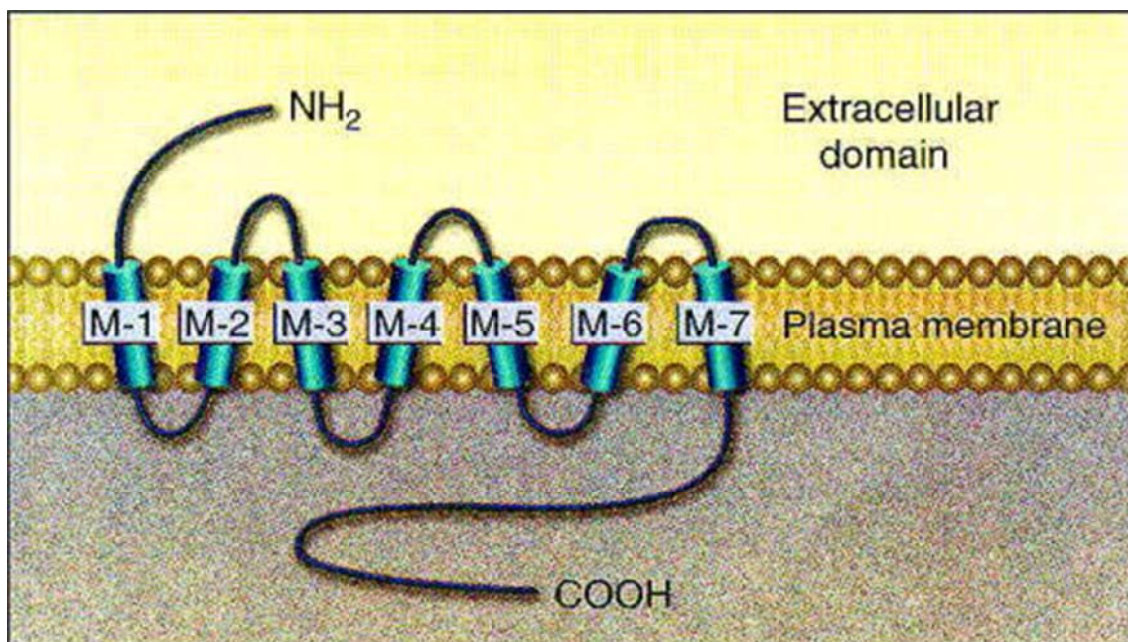


Figura 1. Estrutura dos Receptores Adrenérgicos. Reproduzido de: *Adrenergic Receptors – Evolving Concepts* (Insel, 1996).

Contudo, apresentam particularidades quanto à preferência por um tipo de proteína G: β_2 -AR- G_s , α_1 -AR- G_q , α_2 -AR- G_i , por isso são caracterizados uma rápida ativação promovida por agonistas, bem como deferem quanto ao mecanismo utilizado para a ativação (KIRSTEIN & INSEL, 2004).

2.1 Receptores β -Adrenérgicos: características, localização e função.

Em relação ao adrenoceptor do tipo β_2 , o mecanismo de ativação é via complexo receptor e proteína G, especificamente o subtipo G_s , que são estimulados pelas catecolaminas, levando a ativação da adenil ciclase e acúmulo do segundo mensageiro, neste caso adenosina 3,5 - monofosfato cíclico (AMPc). Além disso, a proteína G_s pode aumentar diretamente a ativação dos canais de cálcio voltagem-dependente existente na membrana plasmática dos músculos esqueléticos e cardíaco como um mecanismo adicional da regulação da função destes tecidos (DIXON et al., 1986; BROWN & BIRNBAUMER, 1988; CASTELLANO et al., 2002).

Todavia, essa peculiaridade de ativação em cada adrenoceptor é descrita na literatura como fator essencial de atuação no processo do controle cardiovascular, com os receptores β que apresentam os subtipos β_1 e β_2 ; e são codificados por genes localizados nos cromossomos 10 e 5, respectivamente (REGAN et al., 1988). Ambos são distribuídos de maneira diferente no corpo humano e apresentam funções distintas (ATALA & CONSOLIM-COLOMBO, 2007).

Esses receptores diferenciam-se conforme sua localização e função, bem como pode ocorrer interação entre si. Em relação à localização no coração, tanto os receptores β_1 quanto o β_2 coexistem, entretanto há um predomínio do β_1 . A relação $\beta_1:\beta_2$ é muito variável, com predomínio nos átrios de β_1 cerca de 60% a 70% sobre β_2 (40%-30%), enquanto que nos ventrículos β_1 atinge cerca de 70% a 80% e β_2 com 30% a 20% (BRODDE & MICHEL, 1999). Estudos demonstraram que no nó sinoatrial a densidade de receptores β é cerca de três vezes maior no átrio adjacente (GUIMARAES & PAIVA, 1981). Sendo assim, tanto nos átrios quanto nos ventrículos tem maior densidade de receptores β_1 , mas que especificamente no Nó Sinoatrial, a densidade de β_2 é maior (ATALA & CONSOLIM-COLOMBO, 2007).

Embora haja um predomínio no coração do receptor β_1 justificando a sua importância, é sabido que o β_2 exibe um acoplamento funcional com a adenilciclase bem mais acentuado do que seu subtipo, favorecendo assim uma ligação mais eficiente. Contudo, o mecanismo pelo qual isso acontece ainda não é conhecido, porém sabe-se que a desigual distribuição dos subtipos de receptores β no coração, pode alterar de maneira heterogênea em situações patológicas, levando a uma redução na densidade do número de receptores disponíveis na membrana celular decorrente da internalização desses receptores. A diminuição na densidade gera o fenômeno de *downregulation*, que ocorre em situações de estímulo excessivo como de hiperatividade simpática mediada pelo aumento exagerado de catecolaminas (ATALA & CONSOLIM-COLOMBO, 2007).

2.2 Receptores α -Adrenérgicos: características, localização e função.

Os receptores α -adrenérgicos se apresentam na forma de dois subtipos: α_1 e α_2 , estando distribuídos de maneira diferente no corpo humano e apresentam funções distintas. São em sua grande maioria pós-juncionais, quando presentes na parede dos

vasos sanguíneos promovem a vasoconstrição e quando no coração aumentam o inotropismo. Apesar de existirem outros receptores adrenérgicos nos vasos (β_2 , e em menor número α_2) a resposta predominante do estímulo simpático vascular é decorrente do efeito da estimulação do receptor α_1 (GUIMARAES et al., 1981; SCHIWINN et al., 1990).

Verificou-se recentemente, a existência de três subtipos de receptores α_1 : α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , que são codificados por genes que se encontram nos cromossomos 8, 5 e 20 respectivamente (SCHIWINN et al., 1990; HIEBLE et al., 1995; MICHEL et al., 1995). Acredita-se que a diferença farmacológica decorra das diferenças de susceptibilidade à dessensibilização dos receptores e ao fato de apresentarem limiares distintos no processo de *downregulation* (YANG et al., 1999).

Os receptores α_1 tem um papel crucial na regulação do tônus vascular pois, mesmo em repouso, o tônus simpático mantém um estado de contração sustentada dos vasos mediada pela ativação desses receptores; quando a atividade simpática é inibida há queda significativa da PA. No coração, foi demonstrado nos ventrículos direito e esquerdo a presença do α_1 -adrenoceptor tem sido demonstrada nos ventrículos direito e esquerdo, porém a sua densidade é muito inferior que o dos receptores β -adrenérgicos (GUIMARAES et al., 1981; MCGRATH, 1982; MINNEMAN, 1988).

Os estudos sobre as vias de sinalização intracelular têm revelado que a ativação do receptor α_1 não aumenta o AMPc, indicando que o sistema “proteína Gs/adenilciclase/AMPc não está envolvido. Foi verificado que no coração de humanos, a noradrenalina leva a um aumento na formação do fosfato inositol através da sua ação no receptor α_1 , com um provável efeito inotrópico positivo. Sugere-se um acoplamento primariamente à via “proteína Gi insensível a fosfolipase/inositol trifosfato/diacilglicerol (plc/ip5/dag). Estudos experimentais demonstraram que este

efeito é no máximo 15 a 35% do efeito evocado pelo estímulo dos receptores β -adrenérgicos (BRODDE et al., 2001).

Portanto, o principal mecanismo da transdução dos sinais para a ativação do α -ADR, compreende a mobilização do cálcio intracelular das reservas endoplasmáticas. Atualmente, acredita-se que este aumento do cálcio resulte da ativação das isoformas da fosfolipase C_β , através da família G_q das proteínas G. A hidrólise dos polifosfoinosítídeos ligados à membrana da fosfolipase C, resulta na produção de dois segundo mensageiros, que são o diacilglicerol (DAG) e o inositol-1,4,5-trifosfato (IP3). Este último interage com os canais de cálcio do retículo sarcoplasmático, liberando o cálcio retido nas reservas intracelulares para o citoplasma, enquanto DAG é um potente ativador da proteína Cinase C (BERRIDGE, 1993).

2.3 Polimorfismo dos Receptores β_2 -Adrenérgicos

A biologia molecular tem contribuído de maneira significativa para a compreensão de como funcionam os genes quando normais e como ocasionam doenças quando modificados. Um gene é a unidade fundamental física e funcional da hereditariedade, que leva informações de uma geração para a seguinte; um segmento de ácido desoxirribonucléico (DNA) composto de uma região transcrita e uma sequência reguladora que possibilita a transcrição (GRIFFITHS et al., 2001).

Em uma população, ocorre a existência de dois ou mais fenótipos alternativos comuns associados a alelos de um gene é denominada de polimorfismo, que pode ser ocasionado por substituição de uma única base nitrogenada (adenina, guanina, citosina, timina) na sequência do DNA de cromossomos homólogos, com ocorrência em pelo menos 1% da população. Essa mudança da base na sequência de DNA

(Figura 2) é denominada de *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), que é também a forma mais comum de ocorrer polimorfismo humano (YOO et al., 2005).

Portanto, como o código genético é degenerado, é descrito na literatura que o polimorfismo pode influenciar o mecanismo de *downregulation* desses receptores, favorecendo o desencadeamento de um estado patológico na função cardiovascular e causar desarranjo de grande relevância do ponto de vista funcional, contribuindo para a fisiopatologia de diversas doenças como a HAS, obesidade, diabetes tipo II, asma e insuficiência cardíaca (YOO et al., 2005).

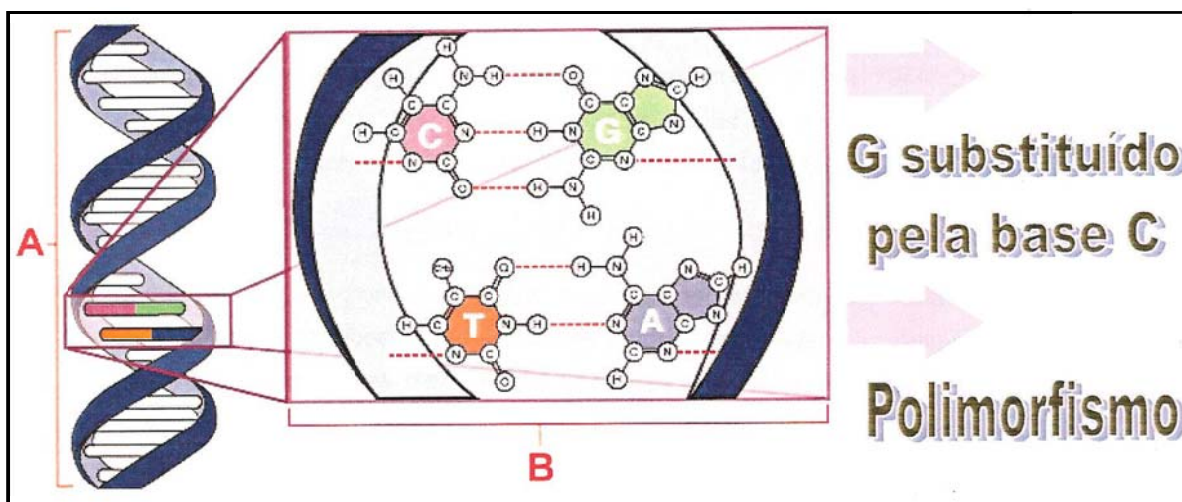


Figura 2. Polimorfismos genéticos.

Reproduzido: <<http://genetics.ncbi.nlm.nih.gov/images/PCRC2.gif>>

O gene que codifica receptor β_2 -adrenérgicos pertence ao cromossomo 5, e apresenta heterogeneidade na população humana, com naturais ocorrências de polimorfismo causada pela mutação do gene que codifica o aminoácido 16 e 27 do N-terminal extracelular do receptor (GREEN et al., 1995).

A variabilidade polimórfica dos genes que codificam os receptores β -adrenérgicos é relativamente comum e bem caracterizada. Até o momento foram descritos 19 tipos de polimorfismos, sendo que pelo menos duas variantes do β_2 -adrenoceptor, códon 27 e 16, estão apresentando relevância funcional e alto grau de heterozigose, o qual é a base para o possível papel fisiopatológico na modulação de características complexas (LARIO et al., 1997).

Na posição 79 do gene do receptor β_2 -adrenoceptor, a alteração do nucleotídeo citosina (C) pelo nucleotídeo guanina (G) resulta em substituição do aminoácido glutamina (Gln) pelo ácido glutâmico (Glu) no códon 27. O alelo Gln, por ser encontrado de forma mais freqüente na população, é designado alelo selvagem; enquanto, o alelo Glu por ser o menos freqüente, é denominado mutante (Gln27Glu, freqüência alélica 0,55/0,45). O polimorfismo do receptor β_2 na posição 16 ocorre em decorrência da troca do nucleotídeo citosina (C) pelo nucleotídeo guanina (G) no gene, com conseqüente substituição do aminoácido arginina (Arg) pela glicina (Gly) quando da síntese protéica (LARGE et al., 1997). A presença do alelo Arg foi inicialmente, considerado o tipo selvagem, porém atualmente se observou que, na verdade, este alelo é o de menor freqüência, o que o colocaria na posição de mutante (Arg/Gly, freqüência alélica 0,40/0,60); apesar disto ele permaneceu com a classificação de tipo selvagem, por ter sido assim inicialmente descrito (CASTELLANO et al., 2003; SMALL et al., 2003; LARIO et al., 2007).

A freqüência dos alelos envolvidos nos polimorfismos β_2 -adrenoceptor varia entre os diferentes grupos étnicos. Em afro-americanos, a freqüência do alelo Arg16 é 49%, enquanto que em brancos e asiáticos a ocorrência desse mesmo alelo é 46% e 59%, respectivamente. No que diz respeito ao alelo Glu27, sua freqüência alélica é de 20%

entre indivíduos afro-americanos. Em brancos e asiáticos, a ocorrência do Glu27 é de 35% e 7%, respectivamente (PEREIRA et al., 2010).

Sabe-se que há um notável desequilíbrio de *linkage* entre os sítios 16 e 27 (BRAY et al., 2000; DRYSDALE et al., 2000; TAYLOR & KENNEDY, 2001), de modo que os indivíduos homozigotos Glu27Glu quase sempre apresentam Gly em homozigose no códon 16 (Gly16Gly). Os indivíduos homozigotos Gln27Gln podem ser homozigotos (Arg16Arg ou Gly16Gly) ou heterozigotos (Arg16Gly) para o códon 16. O haplótipo Arg16Glu27 é encontrado em menos de 1% da população sendo, portanto, muito raro (CASTELLANO et al., 2003; LARIO et al., 2007).

2.4 Polimorfismo dos Receptores α_1 -Adrenérgicos

O α_{1A} -ADR regula o sistema cardíaco e vascular periférico através da ativação simpática, e devido a esta característica é considerado um participante importante na homeostase da PA (RUDNER et al., 1999).

A figura 3 representa o modelo topológico do α_1 -ADR (ROSSKOPF D & MICHEL MC, 2008), sendo que seu gene está localizado no cromossomo 8q21-p11.2 e apresenta alelos polimórficos em vários locais. Um estudo recente (LEI et al., 2005) identificou nove SNPs na região codificadora α_{1A} -adrenoceptor, sendo apenas cinco desses validados, ocorrendo nas posições 1035 (G \rightarrow T), 1175 (G \rightarrow A), 1475 (T \rightarrow C), 1677 (A \rightarrow G) e 1831 (A \rightarrow T) em relação ao local de início da transcrição do gene causam uma mudança na seqüência de aminoácidos (MOCHTAR et al., 2006). Somente um destes cinco SNPs, 1475 (T \rightarrow C), o que induz uma alteração na seqüência de aminoácidos arginina a cisteína (Arg347Cys, previamente descrito como Arg492Cys), pois foi observado que o polimorfismo está localizado na região terminal carboxila do receptor (SHIBATA et al., 1996).

As freqüências alélicas para a Arg e a Cys variam de 45% e 55%, respectivamente, em brancos de ascendência européia. Em asiáticos e africanos, a variante Arg prevalece com freqüências de 0,9% e 0,75%, respectivamente (XIE et al., 1999; KIRSTEIN & INSEL, 2004).

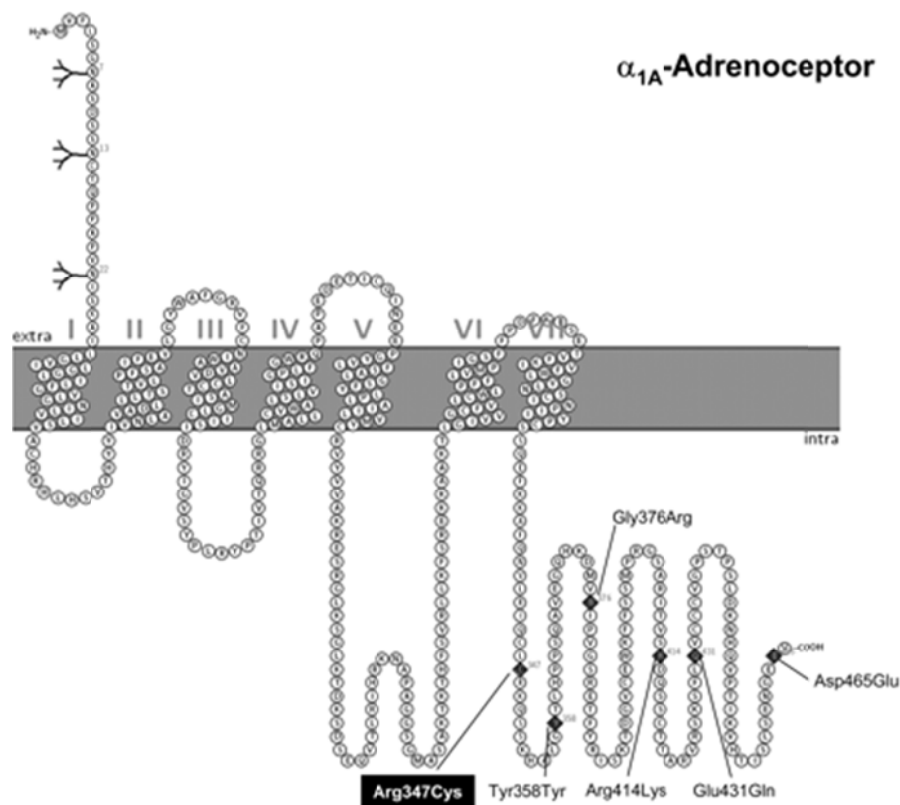


Figura 3. Modelo topológico do receptor α_1 -adrenérgico.

2.5 Polimorfismos β_2 e α_1 -adrenérgicos

A hipertensão arterial pode ser considerada uma doença poligênica e multifatorial, em que alterações genéticas em múltiplos genes, ainda não completamente esclarecidas, interagem entre si e com diversos fatores de risco ambientais (PUDDU et al., 2007). Estudos sobre as bases genéticas da gênese das doenças cardiovasculares, principalmente na HAS vêm permitindo um melhor entendimento dos mecanismos moleculares, bem como novas medidas preventivas e tratamentos precoces, mais

específicos e eficazes (BARRETO FILHO; KRIEGER, 2003). Os genes controladores da pressão sanguínea ainda não são completamente conhecidos, mas estudos familiares têm documentado estes componentes hereditários (SMALL et al.2003,) . Evidências sugerem que cerca de 30% da variação pressórica podem ser de origem genética (RONDINELLI; MOURA NETO, 2003).

Com a perspectiva das técnicas de biologia molecular as pesquisas direcionadas aos fatores genéticos que poderiam estar envolvidos no desenvolvimento da hipertensão têm crescido nos últimos anos. Estas técnicas permitiram verificar que as diferenças hereditárias da função cardiovascular podem estar ligadas a variação do código genético de elementos do sistema simpato-adrenal, incluindo a síntese de transmissores, liberação e recaptação, degradação enzimática e ativação de receptores (FAIRE et al., 2002, MCCAFFERY et al., 2002; BARRETO-FILHO & KRIEGER, 2003).

Há muitas razões para considerar os receptores β_2 -adrenérgicos e sua variabilidade genética como potencial candidato responsáveis na regulação da PA em humanos (CASTELLANO et al., 2002).

O estudo do papel desses polimorfismos no controle da PA e nas doenças cardiovasculares tem sido alvo de grande interesse, entretanto a influência de ambos os polimorfismos na reatividade vascular é bastante controversa. Existe evidência de que indivíduos com o haplótipo selvagem Arg16Arg/Gln27Gln apresentam maior sensibilidade quando comparados aos demais (Gly16Gly/Gln27Gln e Gly16Gly/Glu27Glu) em resposta à administração venosa da terbutalina (SMALL et al., 2003). No entanto, outros trabalhos não foram capazes de demonstrar que exista

diferença na vasodilatação induzida por β_2 agonista, como a terbutalina (DISHY et al., 2001; SMALL et al., 2003). Portanto esse assunto continua controverso.

Alguns estudos (MCCAFFERY et al., 2002; LI et al., 2001) correlacionaram o polimorfismo dos receptores β_2 -adrenérgicos não só com a PA de repouso, mas também com a resposta pressórica destes indivíduos frente a estímulos estressantes (GUIMARÃES & MOURA, 2001). Em relação a variabilidade da FC, ainda são escassos estudos associando o papel dos polimorfismos β_2 .

Há diversidade na literatura quando se refere à variabilidade étnica. Em um estudo envolvendo homens caucasianos foi observado que aqueles que tinham variação de um ponto no códon 16 do receptor β_2 -adrenérgico em heterozigose (Arg16Gly) apresentavam PAS mais elevada (ROSMOND et al., 2000). Ao contrário, BUSJHAN et al., 2000, estudando um grupo de gêmeos residentes na Alemanha, verificou que indivíduos homozigotos Arg16Arg tinham PAS de 7 a 8 mmHg mais elevada do que indivíduos homozigotos Gly16Gly, e indivíduos em heterozigose têm nível pressórico intermediário. No entanto, nesses e muitos outros estudos, o polimorfismo desse receptor adrenérgico não está elucidado quanto à sua correlação com a hiperreatividade pressórica aos testes de simpato-excitação. REORGANIZAR ESSES PARÁGRAFOS.

Por outro lado, não foi encontrada relação entre o polimorfismo do receptor β_2 -adrenérgico e hipertensão em estudos envolvendo negros africanos (CANDY et al., 2000) e indivíduos residentes do sul da Polônia (TOMASZEWSKI et al., 2002). Portanto a associação do polimorfismo de receptores β_2 -adrenérgicos com a PA não está bem definida na literatura, uma vez que os estudos apresentam resultados

contraditórios. O que devemos levar em consideração é que a associação do polimorfismo dos receptores beta adrenérgicos com a HAS poderia estar ligada a fatores étnicos.

Em relação ao polimorfismo do receptor α_1 -adrenérgico na determinação da PA, há poucos trabalhos que relatem tal associação. Alterações genéticas do mesmo podem estar associadas à disfunção do receptor e ter uma contribuição na gênese das doenças cardiovasculares, portanto, isto requer que mais estudos sejam desenvolvidos para melhor compreensão dos fatos, o que justificou o desenvolvimento do presente estudo.

A controvérsia desse receptor é devido a real associação do alelo Arg347 com hipertensão (GUIMARAES S & PAIVA MQ, 1981; COCKCROFT et al., 2000; GUIMARÃES & MOURA, 2001; PEREIRA et al., 2010). Outras formas de associar esses polimorfismos na reatividade vascular é através dos testes de simpato-excitação.

Mediante tais divergências descritas na literatura, se faz necessário explicar estudos relevantes com suas características principais como a população estudada e associação com polimorfismos adrenérgicos (Tabela 2).

Como se pode ver na tabela 2 o polimorfismo nas doenças cardiovasculares tem sido investigado basicamente na HAS e obesidade, sendo que na metade desses estudos apresentou associação com polimorfismo e na outra metade não apresentou associação. Nesses estudos apenas um incluiu indivíduos a manobra do *Handgrip* em indivíduos normotensos.

Tabela 2 - Exemplos de estudos na literatura envolvendo o polimorfismo β_2 -adrenérgico (Arg16Gly).

Autores	População	Sujeitos	Associação polimorfismo
Large et al.; 1997	Suécia	Mulheres brancas obesas	Associação com a obesidade
Hayakawa et al.; 2000	Japão	210 homens	Sem associação com a obesidade
Jia et al.; 2000	EUA	Caucasianos: 298 hipertensos vs. 298 normotensos	Sem associação com a hipertensão arterial
Xie et al.; 2000	EUA	Sujeitos negros e brancos hipertensos	Sem associação com a hipertensão arterial
Candy et al.; 2000	Inglaterra	Homens negros afro-ingleses 192 hipertensos e 123 normotensos	Sem associação com a hipertensão arterial
Cockcroft et al.; 2000	Caucasianos	127 homens normotensos	Associação para HAS nos sujeitos Gly16
Pereira et al.; 2003	Brasil	1576 homens e mulheres etnia mestiça	Associação com PAS e IMC
The Olivetti heart study, 2004	Itália	993 homens de 55 a 65 anos de idade	Sem associação com obesidade e HAS
Trombetta et al.; 2005	Brasil	Mulheres saudáveis	Associação com a HAS
Eisenach et al.; 2005	EUA	47 caucasianos e latinos, normotensos	Associação Gly16 com hiper-reatividade ao Handgrip
Masuo et al.; 2006	Japão	Homens não obesos e normotensos	Associação com obesidade e HAS

Tabela 3 - Exemplos de estudos na literatura envolvendo o polimorfismo β_2 -adrenérgico (Gln27Glu).

Autores	População	Sujeitos	Associação polimorfismo
Large et al.; 1997	Suécia	Mulheres caucasianas obesas	Associação com a obesidade
Echwald et al.; 1998	Dinamarca	Homens caucasianos obesos	Sem associação com obesidade e hipertensão arterial
Hayakawa et al.; 2000	Japão	210 homens	Sem associação com a obesidade
Xie et al.; 2000	EUA	Sujeitos negros e brancos hipertensos	Sem associação com a hipertensão arterial
Candy et al.; 2000	Inglaterra	Homens negros afro-ingleses, 192 hipertensos e 123 normotensos	Sem associação com a hipertensão arterial
Kato et al.; 2001	Japão	842 homens hipertensos e 633 homens normotensos	Associação para hipertensão nos sujeitos com Glu27
Pereira et al.; 2003	Brasil	1576 homens e mulheres de etnia mestiça	Sem associação com IMC ou elevação da PAS
The Olivetti heart study, 2004	Itália	993 homens de 55 a 65 anos de idade	Sem associação com obesidade e hipertensão arterial
Trombetta et al.; 2005	Brasil	Mulheres saudáveis	Associação com a hipertensão
Masuo et al.; 2007	Japão	219 homens não obesos e normotensos	Sem associação com a hipertensão arterial e diabetes

Tabela 4 - Exemplos de estudos na literatura envolvendo o polimorfismo α_1 -adrenérgico (Arg492Cys).

Autores	População	Sujeitos	Associação polimorfismo
Büscher et al., 1999	EUA	Homens(caucasianos/afro-americano) 24 hipertensos e 21 normotensos	Sem associação com hipertensão arterial
Xie et al.; 2000	EUA	Americanos negros e brancos, sujeitos normo / hipertensos	Sem associação com hipertensão arterial
Candy et al.; 2000	Inglaterra	Homens afro-ingleses, 192 hipertensos e 123 normotensos	Sem associação com hipertensão arterial
Pereira et al.; 2003	Brasil	1576 de etnia mestiça	Sem associação com obesidade e hipertensão
Sofowora et al.; 2004	EUA	74 adultos saudáveis e não tabagistas	Sem associação com hiper-reatividade a fenilefrina
Iacoviello et al.; 2006	Itália	109 mulheres jovens normotensas com/sem história familiar para hipertensão	Sem associação Cys492 na história familiar para hipertensão
Masuo et al.; 2007	Japão	219 homens não obesos e hipertensos	Sem associação com hipertensão e diabetes

Uma vez que o polimorfismo do receptor β_2 -adrenérgicos contribui na determinação da hiper-reatividade vascular, estas variações genéticas podem estar associadas à disfunção do receptor e podem ter um papel na etiologia da hipertensão ou na resposta à terapia medicamentosa destes indivíduos e isto requer que mais estudos sejam desenvolvidos para melhor compreensão destes mecanismos.

Portanto, as possíveis interações entre fatores ambientais e fatores geneticamente determinados devem ser consideradas, para que estes pacientes possam ser diagnosticados e tratados de forma mais efetiva. Entretanto, não existe até o presente

momento evidencia de que fatores genéticos relacionados à hipertensão limítrofe e sendo estes indivíduos hiperreatores aos testes de estresse (SANNERSTEDT R, 1966; WOOD et al., 1984; TUOMISTO, 1997, HERKENHOFF et al., 2001). Portanto, consideramos que seria interessante estudar se há associação do polimorfismo de receptores adrenérgicos com a hiper-reatividade em indivíduos normotensos.

OBJETIVO

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar a associação do polimorfismo dos receptores β_2 e α_1 -adrenérgicos com a resposta pressórica e cronotrópica exagerada durante os testes laboratoriais de estresse, em indivíduos normotensos.

2.2 Objetivos Específicos

a) Descrever o comportamento da pressão arterial e frequência cardíaca frente aos testes estressores, estabelecendo pontos de delimitação entre normalidade e hiperreatividade cardiovascular a estes testes.

b) Analisar a associação do polimorfismo dos receptores β_2 -adrenérgicos vasculares na resposta pressórica e cronotrópica durante o teste de estresse mental (*Stroop Color Test*), teste de estresse somato-nocivo (*Cold Pressor Test*) e exercício isométrico de preensão manual (*Handgrip*).

c) Avaliar a associação do polimorfismo dos receptores α_1 -adrenérgicos vasculares na resposta pressórica durante o teste de estresse somato-nocivo (*Cold Pressor Test*).

d) Correlacionar as respostas hemodinâmicas com o gênero e história de antecedentes familiares dos testes estressores.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Tipo de Estudo

Estudo prospectivo, transversal e analítico.

3.2 Seleção da Amostra

A amostra foi constituída por voluntários, estudantes e funcionários, da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de misericórdia de Vitória – EMESCAM.

Para cálculo da amostra levamos em conta que nossa análise tratava de variáveis tanto *nominais* (proporções) como também *intervalares* (médias) dentro de uma população *finita*. No caso de proporções independentes, com base na literatura, assumimos um erro tipo I (α) igual a 0,05 (bi-caudal) e um erro tipo II (β) igual a 0,20. Considerando que desejávamos detectar uma diferença de pelo menos 15 entre proporções comparadas, a amostra total calculada foi de 94 indivíduos. No caso de médias independentes, com base na literatura, assumimos um erro tipo I (α) igual a 0,05 (bi-caudal) e um erro tipo II (β) igual a 0,20. Considerando que desejávamos detectar uma diferença de pelo menos 5 entre 2 médias, ambas com desvio padrão de 8, a amostra total calculada foi de 82 indivíduos. Para cálculo da amostra foi utilizado o *software* MedCalc, versão 11.5.1.0 (Medcalc Software, Mariakerke Belgium). A análise do poder da amostra (Power Test), feito através do *software* G-Power (v 3.1.2, Franz Faul, Universität Kiel, Alemanha), foi igual a 0.807, o qual é considerado como de grande efeito (FAUL et al., 2007).

Todos os voluntários foram informados detalhadamente sobre o estudo e após concordarem com os termos, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE - Anexo 3.2A). Conforme projeto provado pelo Comitê de Ética em

Pesquisa (parecer em ANEXO 3.2B) utilizou-se critérios de inclusão e exclusão para a seleção da amostra relacionada abaixo:

3.2.1 Critérios de Inclusão

- a) Indivíduos que aceitaram assinar o TCLE.
- b) Indivíduos de ambos os sexos;
- c) Idade entre 20 e 42 anos;
- d) Sedentários.

3.2.2 Critérios de Exclusão

- a) Presença de doença cardiovascular;
- b) Diabetes mellitus;
- c) Obesidade (Índice de Massa Corporal; $IMC > 30 \text{ Kg/m}^2$).

3.3 Sequência Experimental

Todos os indivíduos foram submetidos a uma avaliação inicial, composta por perguntas diretas a respeito de hábitos de vida, como tabagismo, etilismo, realização regular ou não de atividade física, uso habitual de medicamentos e história de antecedente familiar para doenças cardiovasculares. Após avaliação clínica inicial, os candidatos que preencheram os critérios de inclusão foram submetidos às etapas descritas a seguir, com intervalo mínimo de três dias.

Etapas 1 – Coleta de amostras de sangue venoso periférico de jejum de 12 horas, para a extração do DNA e avaliação bioquímica: glicemia de jejum, colesterol total e frações, triglicérides.

Etapas 2 – Medidas antropométricas e de PA casual.

Etapa 3 – Avaliação da resposta pressórica e cronotrópica aos testes de exercício isométrico de preensão manual (*Handgrip*), estresse mental (*Stroop test*) e pressórico ao frio (*Cold pressor test*). Todos os participantes chegaram ao laboratório que era mantido a uma temperatura constante. Inicialmente, foram posicionados em posição sentada. Colocado o manguito no membro superior não dominante, para medida da pressão arterial a cada minuto, a seguir, foi realizada medida basal da PA (3 medidas). A aplicação dos testes foi realizada de forma randômica para cada indivíduo. E entre um teste e outro havia um intervalo de 10 minutos ou até aguardava-se que as medidas de PA e FC retornassem a condição basal.

3.4 Avaliação Antropométrica

Foi aferido o peso corporal (kg), a altura (m) e calculado o Índice de Massa Corporal (IMC = peso/altura²).

3.5 Coleta de sangue

O sangue foi coletado por um profissional qualificado, sendo o procedimento realizado em jejum e estando o paciente em repouso, e obtendo-se 3 amostras em tubos diferentes, um contendo EDTA para a extração do DNA, um contendo fluoreto de sódio, para a análise da glicemia de jejum e um outro tubo para a análise do perfil bioquímico.

3.6 Extração de DNA

Para a extração do DNA genômico foi utilizada amostra de sangue (10 mL) contida nos tubos com EDTA (MARANHÃO & MORAES, 2003). Os DNA totais foram obtidos pela técnica de extração sal-clorofórmio a partir de leucócitos de sangue periférico. A

quantificação dos DNAs foi analisada pelo espectrofotômetro (1,0 unidade DO 260 = 50 µg/ml). As amostras de soro e leucócitos contendo o DNA foram armazenadas em duplicata, no Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da UFES, sob a responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Silvana dos Santos Meyrelles. Posteriormente as amplificações dos seguimentos do gene dos receptores adrenérgicos foram realizadas através de um termociclador (Eppendorf, São Paulo, Brasil).

3.6.1 Amplificação por PCR do Segmento de DNA Contendo o Códon 27 do receptor β_2 adrenérgico

Os segmentos que foram amplificados contendo o códon 27 do receptor β_2 adrenérgico foram realizados em volume de 30 µl contendo aproximadamente 300 µg de DNA, 100 mM de desoxinucleotídeos (DNTP), tampão 10% (100 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl, pH 8.3), 10% DMSO, 20 pmol de cada "primer", e 1 unidade de Taq DNA polimerase, conforme descrito anteriormente (LARGE et al., 1997).

O primer senso foi 5'-GGCCCATGACCAGATCAGCA-3' e o primer reverso foi 5'-GAATGAGGCTTCCAGGCGTC-3'. O processo de PCR iniciou com desnaturação a 94°C por 4 min, seguidos por 30 ciclos de desnaturação (94°C, 1 min), hibridação (63°C, 1 min), e extensão (72°C, 1 min), com uma extensão final a 72°C por 10 min. O produto de PCR contém 353 pares de base (pb), sendo utilizado gel com 0,45 g de agarose ultra pura e 30 ml de TBE, após polimerização e "corrida" a 80 volts dos pares de base de cada produto de PCR, o gel foi corado com brometo de *ethidium* e através do transluminador, foi possível visualizar a presença de bandas no produto de PCR. O produto amplificado foi digerido a 37°C por 3 horas com a ação de uma enzima de restrição, na quantidade de 2 U de Fnu4HI. O produto de digestão foi visualizado em gel de acrilamida a 10% (2,5 ml de bis-acrilamida, 1,0 ml de TBE, 7 µl de TEMED, 70 µl de APS e completar com água deionizada até atingir um volume final

de 10 ml) e visualizado após processo de coloração em 3 etapas: inicialmente com a solução fixadora por 6 minutos de ácido acético a 0,5% e álcool 10%; seguida da utilização da solução de nitrato de prata por 15 minutos; e finalizando com a solução reveladora composta por 675 µl de formaldeído, 3,75 g de NaOH e água destilada até completar um volume final de 250 ml. Os fragmentos de produtos de digestão dos tamanhos: 27 55, 97, e 174 pb no homozigotos Gln27; 27, 55, 97, 174, e 229 pb no heterozigoto Gln27Glu27; e 27, 97, e 229pb no homozigotos Glu27.



Figura 4 - *Check-gel* em acrilamida a 10%. A primeira coluna representa o ladder de 50bp (L50), seguido da segunda coluna mostrando o fragmento íntegro do PCR, antes de sofrer a clivagem pela enzima de restrição, para uma bateria de 10 amostras (1C a 10C).

3.6.2 Amplificação por PCR do segmento de DNA contendo o códon 16 do receptor β_2 -adrenérgico

A amplificação do segmento de DNA contendo códon 16 do β_2 -adrenérgico foi realizada semelhante ao códon 27, mas utilizando os "primers" senso 5'-CTTCTTGCTGGCACGCAAT-3' e o "primer" anti-senso 5'-CCAGTGAAGTGATGAAGTAGTTGG-3'. A temperatura de hibridação foi de 56°C excluindo-se o DMSO. O produto de PCR apresenta 201 pb. O produto de amplificação foi digerido a 37°C por 3 horas com 2 U de BsrDI. O produto de digestão foi visualizado em gel de acrilamida a 10% (2,5 ml de bis-acrilamida, 1,0 ml de TBE, 7 µl de TEMED, 70 µl de APS e

completar com água deionizada até atingir um volume final de 10 ml) e visualizado após processo de coloração em 3 etapas: inicialmente com a solução fixadora por 6 minutos de ácido acético a 0,5% e álcool 10%; seguida da utilização da solução de nitrato de prata por 15 minutos; e finalizando com a solução reveladora composta por 675 µl de formaldeído, 3,75 g de NaOH e água destilada até completar um volume final de 250 ml.. A digestão produziu fragmentos dos tamanhos: 14 56 e 131 bp nos homozigotos Arg16; 14, 23, 56, 108, e 131 bp heterozigotos Arg16Gly16; e 14, 23, 56, e 108 pb nos homozigotos Gly16.

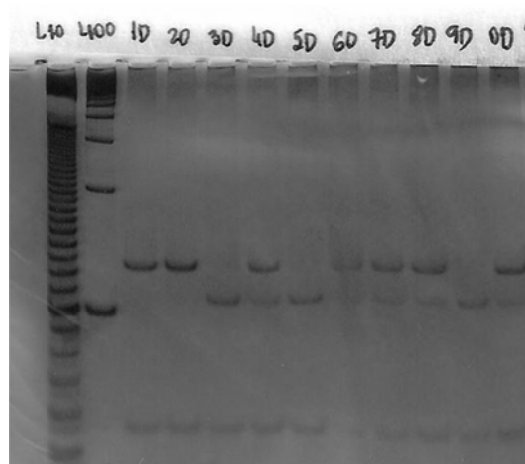


Figura 5 - Check-gel em acrilamida a 10%. Na figura podemos observar o ladder de 10bp e 100bp (L10 e L100), na primeira e segunda colunas seguido de amostras com fragmentos de interesse no estudo.

3.6.3 Amplificação por PCR do segmento de DNA contendo o códon 492 do receptor α_1 -adrenérgico

A amplificação foi realizada de maneira semelhante à anteriormente descrita, com 100ng do DNA genômico e 0,625 µmol de cada primer, sendo o primer senso 5'-ATGCTCCAGCCAAGAGTTCA-3' e o primer anti-senso 5'-TCCAAGAAGAGCTGGCCTTC-3'. A amplificação por PCR consiste em desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 55°C por 30s e 72°C por 1 min, por 30 ciclos. O produto de amplificação resultou em um fragmento com 502 pb o qual foi digerido a

37°C por pelo menos 3 horas com 2 U de PstI. O fragmento foi visualizado em gel de acrilamida utilizado em protocolos anteriores. O alelo não digerido (representando o resíduo do nucleotídeo T, codificando Arg492) designado *wild-type* (502bp). O alelo digerido (base C ou Cys492) definido como *mutant-type* (477bp), o qual resulta em fragmento com 25 e 477 bp (XIE et al., 1999).

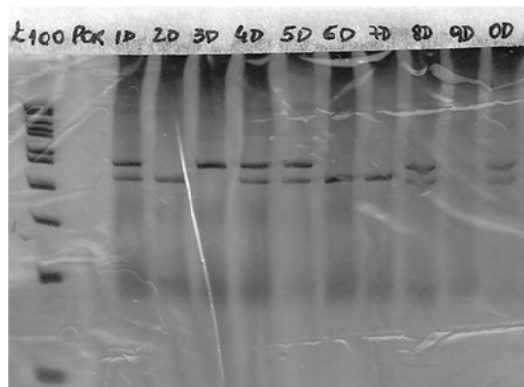


Figura 6 - Check-gel em acrilamida a 10%. Na figura podemos observar o ladder de 100bp (L100) na primeira coluna à esquerda, seguido de fragmento íntegro do PCR, antes de sofrer a clivagem pela enzima de restrição.

3.7 Teste de Reatividade os Estresses

3.7.1 Estresse mental (*Stroop test*)

O teste de estresse mental foi realizado através do teste de conflito cor/palavra, o qual consiste em apresentar uma tabela que possui uma série de nomes de cores, escritos com uma tinta diferente daquela do significado da palavra (HERKENHOFF et al., 1994). O participante foi orientado a dizer, em voz alta e a mais rápida possível, qual a cor em que a palavra está escrita e não o significado da palavra. Este procedimento foi realizado da seguinte maneira: 3 minutos de registro basal, seguidos de 4 minutos de teste de cores e 3 minutos de recuperação.

VERMELHO	AZUL	VERMELHO	VERDE	VERMELHO	AZUL	VERMELHO
AZUL	VERDE	AZUL	VERMELHO	AZUL	VERDE	AZUL
VERDE	VERMELHO	VERDE	AZUL	VERDE	VERMELHO	VERDE
VERDE	AZUL	VERMELHO	AZUL	VERDE	AZUL	VERMELHO
AZUL	VERDE	VERMELHO	VERMELHO	AZUL	VERDE	AZUL
VERMELHO	AZUL	VERDE	AZUL	VERMELHO	AZUL	VERDE
AZUL	AZUL	VERMELHO	VERMELHO	VERDE	AZUL	VERMELHO
VERDE	VERMELHO	AZUL	AZUL	VERDE	VERMELHO	AZUL
VERDE	VERMELHO	VERDE	VERDE	VERDE	VERMELHO	VERDE
VERMELHO	AZUL	VERMELHO	VERDE	VERMELHO	AZUL	VERMELHO
AZUL	VERMELHO	AZUL	AZUL	VERDE	VERDE	AZUL
VERDE	VERMELHO	AZUL	VERDE	VERDE	VERMELHO	VERDE

Figura 7 - Esquema mostrando a folha de teste de conflito cor/ palavras (teste de Stroop) aplicado a cada um dos voluntários.

3.7.2 Teste pressórico ao frio (*Cold pressor test*)

Os indivíduos foram instruídos a submergirem a mão espalmada até o nível do cotovelo em um recipiente contendo água e gelo mantido na temperatura de 4° C, e somente retirá-la quando forem autorizados. Os pacientes permaneceram nesta condição no máximo durante 2 minutos, mas não são previamente informados sobre a duração do teste nem a temperatura da água (HERKENHOFF et al., 1994). O teste pressórico do frio se constitui num procedimento no qual os indivíduos cumprem as determinações do experimentados e se submetem passivamente ao estímulo aversivo.



Figura 8 - Indivíduo com a submersão do braço em água gelada durante o teste pressórico ao frio (*Cold pressor test*).

3.7.3 Exercício isométrico de preensão manual (*Handgrip test*)

Inicialmente foram coletadas 3 medidas da força de preensão manual (*handgrip*) utilizando um dinamômetro digital (DayHome, USA) (Figura 9), com o membro superior dominante, para determinar a contração voluntária máxima (CVM). Durante o protocolo foi feito registro das variáveis PA e FC, durante 3 minutos com o indivíduo em repouso e em seguida realizado contração isométrica a 30% da CVM durante 3 minutos, sendo que ao final do 3º minuto de exercício foi realizada uma parada circulatória durante 2 minutos, através da insuflação de um manguito de pressão que permaneceu localizado no braço do indivíduo e o mesmo foi instruído a respirar normalmente e evitar a realização de manobra de valsalva.



Figura 9 - Indivíduo utilizando o dinamômetro digital para a verificação de sua força de preensão isométrica.

3.7.4 Avaliação da pressão arterial durante o estresse mental, teste pressórico ao frio e exercício isométrico

Os valores pressóricos foram medidos continuamente, a cada minuto, através de um aparelho automático (Omron, modelo HEM-705CP, Omron Healthcare Inc., Illinois, USA). Foi colocado um manguito de tamanho adequado em torno do membro superior

não dominante. Esse manguito foi conectado a um monitor de pressão arterial digital, o qual registrou a PAS, PAD e FC a cada minuto.

Após a avaliação, foi necessário estruturar uma classificação quanto à variação pressórica para determinação e classificação do nível de reatividade nesses indivíduos. Devido à ausência na literatura de dados que descrevem essa classificação, principalmente para indivíduos normais, foi necessário realizar uma padronização. Visando um maior rigor, optamos por utilizar o percentil 75º das respostas pressóricas e cronotrópicas para classificar os indivíduos hiper-reativos (ver figuras 13 e 14 em Resultados).



Figura 10 - Aparelho automático (oscilométrico) utilizado para a aferição da pressão arterial casual e nos testes de estresses.

3.8 Análise estatística

As variáveis contínuas são apresentadas como média \pm desvio padrão (DP) ou quartis para as outras variáveis que não apresentassem distribuição normal. As variáveis categóricas são apresentadas como frequência de distribuição e proporção. Os valores das variáveis contínuas foram comparados utilizando-se o teste *t* de *Student* para amostras independentes, quando apropriado. Na análise não-paramétrica de

variáveis categóricas, estas foram comparadas utilizando-se o χ^2 (qui-quadrado), incluindo o teste de comparação de proporções. Foram consideradas significantes as diferenças entre duas amostras quando $p < 0.05$.

Em relação à análise genética, foi realizado o teste de Hardy-Weinberg para obter as frequências alélicas e genotípicas e verificar se a população estudada está em equilíbrio genético. Seguido da análise do desequilíbrio de ligação, de modo manual e posteriormente confirmado através do *software Arlequin 3.11 (freeware)* para análise de dados de genética populacional.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Os resultados são apresentados primeiro analisando o grupo total de indivíduos nas características antropométricas e perfil bioquímico, seguido dos valores da PA em relação aos testes de reatividade pressórica: preensão manual isométrico (*Handgrip*), teste de estresse mental (*Stroop*) e teste ao frio (*Cold Pressor*). A seguir, os dados são apresentados seguindo uma classificação de acordo com a presença dos diferentes genótipos para os polimorfismos dos receptores adrenérgicos estudados.

4.1. Análise geral da amostra

4.1.1. Análise dos dados antropométricos e demográficos na população geral.

A amostra foi constituída inicialmente de 100 jovens, todavia 2 foram excluídos por não darem continuidade a todos os testes programados. Portanto, 98 jovens – adultos de ambos os sexos, que aderiram voluntariamente ao projeto de pesquisa. Esses foram recrutados através de cartazes e convocações nas salas de aula nas dependências de uma instituição de ensino superior na área da saúde.

Critérios de inclusão: assinatura do TCLE, idade de 18 a 45 anos, sedentários.

Critérios de exclusão: pressão arterial classificada como hipertenso (PAS/PAD \geq 140/90 mmHg) e obesos (IMC \geq 30 Kg/cm²).

As características gerais da amostra estudada estão representadas na Tabela 5. Do total de 98 indivíduos, 48 foram homens e 50 foram mulheres, com média de idade 27 ± 6 anos e índice de massa corpórea de 22 ± 2 Kg/m². Todos os voluntários apresentaram um IMC dentro da normalidade (considerando-se a faixa de normalidade 18,5 a 24,9 Kg/m² (V Diretrizes Brasileira de Hipertensão Arterial, 2006)).

Em relação à característica étnica da amostra, dos 98 voluntários avaliados, 81% foram classificados de etnia branca, 10% de etnia parda e 7% de negros. Outro fator considerado na avaliação da amostra foi a identificação dos indivíduos com história de antecedentes familiares para doenças cardiovasculares, sendo que do total da amostra, 27% dos voluntários relataram possuir antecedente familiar para a doença e a maior parte, 73% sem antecedentes familiares.

O perfil bioquímico dos indivíduos avaliados estava dentro dos limites da normalidade, tanto para homens como mulheres, como mostra a Tabela 5.

Tabela 5 - Características gerais e perfil bioquímico dos sujeitos da amostra.

Parâmetros	Grupos			p-valor
	Mulheres (50)	Homens (48)	Total (98)	
Idade (anos)	27 ± 7	26 ± 4	27 ± 6	0,082
Altura (m)	1,6 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,1	0,094
IMC (Kg/m ²)	21 ± 2	23 ± 2	22 ± 2	0,090
Antecedentes familiares DCV, sim/não	10/40	17/31	27/71	0,015*
Glicose (mg/dL)	86 ± 11	85 ± 9	86 ± 10	0,260
Colesterol Total (mg/dL)	174 ± 35	165 ± 27	170 ± 32	0,084
LDL (mg/dL)	103 ± 30	100 ± 25	101 ± 27	0,326
HDL (mg/dL)	55 ± 11	48 ± 11	51 ± 12	0,164
Triglicerídeos (mg/dL)	84 ± 49	92 ± 44	87 ± 47	0,399

IMC: índice de massa corpórea (Kg/m²), DCV: doenças cardiovasculares, LDL: *Low Density Lipoprotein* (mg/dL), HDL: *High-density lipoprotein* (mg/dL). Valores representam a média ± desvio padrão. p calculado pelo teste *t* de Student. * Diferença significativa na proporção de antecedentes familiares comparando homens e mulheres (teste de X²).

4.1.2. Características hemodinâmicas da amostra nos testes de estresse.

Na figura 11 são apresentadas as médias das medidas casuais de pressão arterial e frequência cardíaca, nas quais foi observado que os homens apresentam valores pressóricos significativamente mais elevados (PAS/PAD: 119 ± 11 / 73 ± 7 mmHg), quando comparado às mulheres (PAS/PAD: 104 ± 9 / 68 ± 7 mmHg, $p < 0,05$). Na FC observou-se que as mulheres apresentaram valores significativamente mais elevados que os homens (80 ± 9 vs. 73 ± 11 bpm).

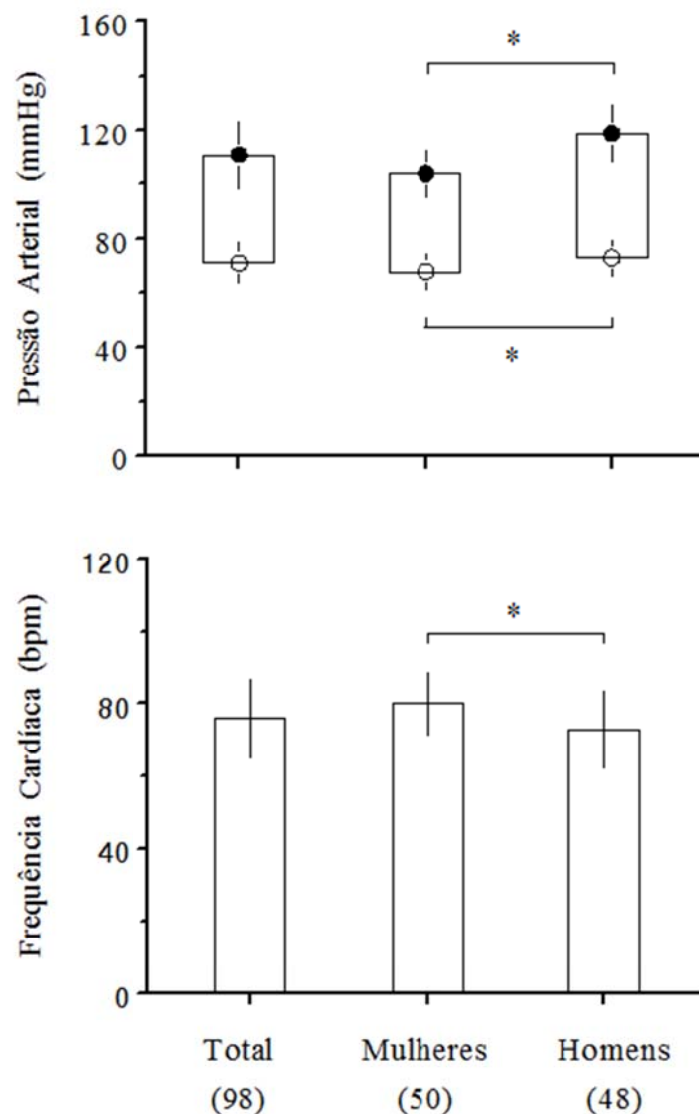


Figura 11. Valores de medidas casuais de pressão arterial sistólica (●) e diastólica (○) e frequência cardíaca. Valores representam a média \pm desvio padrão. * $p < 0.05$ entre gêneros (teste t de Student para amostras independentes).

4.2 Testes de Estresse:

Os valores de PAS, PAD e FC pré-testes (Anexo 4.2) foram similares àqueles das medidas casuais realizadas para triagem dos indivíduos para a amostra. Foram realizadas mensurações nos parâmetros pressóricos e cronotrópicos ao 1º, 2º, 3º e 4º minuto pós-teste de estresse e também no período de recuperação. Considerando que as respostas, em cada um dos três testes, foram máximas em tempos diferentes, optamos por utilizar aquele tempo de maior magnitude na resposta, sendo o 3º minuto no teste isométrico de preensão manual (*handgrip*), 4º minuto do teste de estresse mental (*Stroop*) e no 2º minuto no teste ao frio (*Cold pressor*).

Além da influência do gênero nos parâmetros cardiovasculares e, conforme mostrado na tabela 5, observamos em nossa amostra diferenças significantes na proporção de indivíduos com (N=27) e sem (N=71) história de antecedentes familiares para doenças cardiovasculares. Por isso, quantificamos a média de respostas pressóricas e cronotrópicas em cada uma das manobras estressoras. Como se observa na figura 12, quando comparados com os indivíduos sem história de antecedentes familiares para doenças cardiovasculares, aqueles com história responderam com maiores aumentos de PAS no teste de estresse mental e com maiores aumentos de PAD nos três testes. Não observamos diferenças significantes quanto à resposta na FC nos dois grupos.

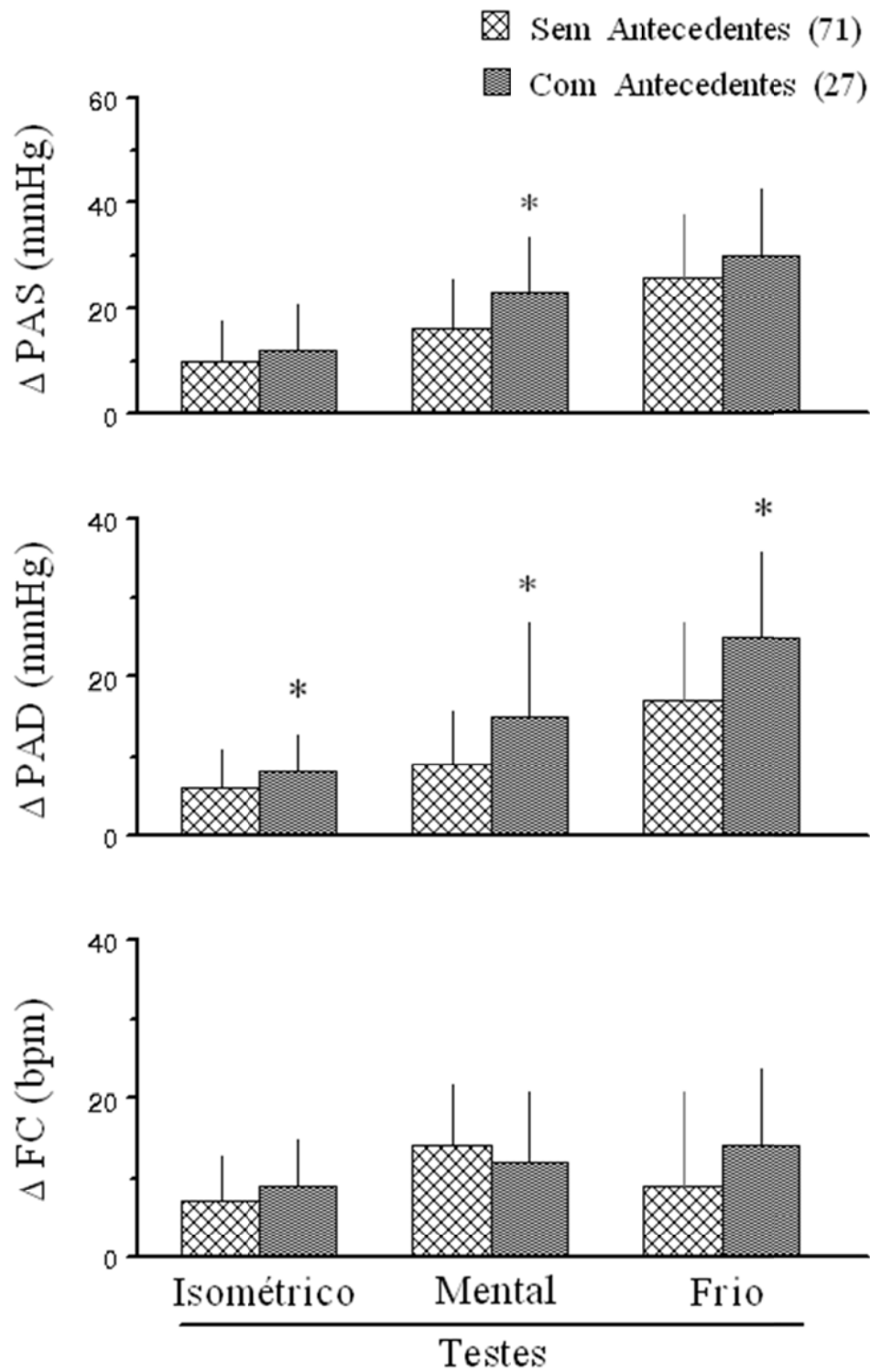


Figura 12. Alterações absolutas de PAS, PAD e FC durante os três testes de estresse, comparando indivíduos sem e com história de antecedentes familiares para doenças cardiovasculares. * $p < 0,05$ comparado com os indivíduos sem história familiar (teste χ^2).